

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

①⑨ **RÉPUBLIQUE FRANÇAISE**
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① **N° de publication :**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 715 938

②① **N° d'enregistrement national :**

94 01530

⑤① **Int Cl[®] : C 12 N 7/01, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68, A 61 K 31/70,
38/16, C 07 K 14/15**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② **Date de dépôt :** 04.02.94.

③⑦ **Priorité :**

④③ **Date de la mise à disposition du public de la
demande :** 11.08.95 Bulletin 95/32.

⑤⑥ **Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥⑦ **Références à d'autres documents nationaux
apparentés :**

⑦① **Demandeur(s) :** *Société Anonyme dite: BIO
MERIEUX — FR.*

⑦② **Inventeur(s) :** *Perron Hervé, Mallet François,
Mandrand Bernard, Bedin Frédéric et Beseme
Frédéric.*

⑦③ **Titulaire(s) :**

⑦④ **Mandataire :** *Cabinet Germain & Maureau.*

⑤④ **Constituants nucléiques du virus MSRV1, associé à la sclérose en plaques.**

⑤⑦ L'invention concerne un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne en outre les constituants nucléiques desdits virus et leurs utilisations.

FR 2 715 938 - A1



**Constituants nucléiques du virus MSRV1,
associé à la sclérose en plaques**

La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie
démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la
5 cause reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une
étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus
connus testés ne s'est avéré être l'agent causal
recherché: une revue des virus recherchés depuis des
10 années dans la SEP a été faite par E. Norrby (Prog. Med.
Virol., 1978; 24, 1-39) et R.T. Johnson (dans "Handbook of
clinical neurology, 47 Demyelinating diseases". Vinken P.
et Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier science
Publishing, 1985, 319-336). Parallèlement, la possibilité
15 d'un facteur exogène et/ou infectieux est suggérée par
l'existence d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP
comme ce qui a été observé dans les Iles Feroes entre 1943
et 1960 (Cook 1980), en Sardaigne (Rosati, 1988), en
Norvège (Riisse, 1991), ainsi que par les études sur les
20 migrants (Elian, 1990). Parmi tous les facteurs exogènes
suggérés, les virus ont été étudiés le plus souvent et une
étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP, de phénomènes
assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à
25 une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle" (voir:
Lisak R.P., Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977; 297, 850-
853, et, Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch. Neurol.
1979; 36, 490-497) . Cependant, cette auto-immunité
dirigée contre certains composants du SNC s'est révélée
30 peu spécifique de la SEP et fréquente dans les
inflammations du SNC, associées ou non à une infection,
ainsi que cela a été montré par Hirayama M. et coll.
(Neurology 1986; 36, 276-8), Kenneth G. Warren et coll.
(Annals of Neurology 1986; 20, 20-25), Suzumura A. et
35 coll. (Journal of Neuroimmunology 1986; 11, 137-47), et,
Tourtelotte W. et coll. (Journal of Neurochemistry 1986;

46, 1086-93). De plus, comme l'a fait remarquer E.J. Field (The Lancet 1989; I, 1272.) aucune des thérapeutiques immunosuppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP. Il semble maintenant probable que
5 les manifestations "auto-immunes" sont induites par un mécanisme d'origine virale : co-sensibilisation à des déterminants viraux associés à des molécules d'origine cellulaire, phénomènes de mimétisme moléculaire -comme cela a été décrit par Fujinami R.S et Oldstone M.B.A.
10 (dans "Molecular mimicry : Cross-reactivity between microbes and host proteins as a cause of autoimmunity". Oldstone M.B.A., ed.. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin, Springer-Verlag, 1989)- ou, selon P. Rudge (Journal of Neurology, Neurosurgery and
15 Psychiatry, 1991 54, 853-855), par expression de superantigènes rétroviraux .

Des travaux ont étayé une hypothèse selon laquelle un Rétrovirus serait à l'origine de la maladie : la découverte récente par A. Gessain et coll. (J. Infect.
20 Disease 1988; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs, tels que H. Koprowski et coll. (Nature 1985; 318, 154), M.Ohta et coll. (J. Immunol. 1986; 137, 3440), E. P. Reddy
25 et coll. (Science 1989; 243, 529), S.J. Greenberg et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86, 2878), J.H. Richardson et coll. (Science 1989; 246, 821), S.L. Hauser et coll. (Nature 1986; 322, 176) et A. Karpas et coll. (Nature 1986; 322, 177), à rechercher une implication de
30 ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.

Par ailleurs, il existe un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus MAEDI-VISNA du mouton. Il est connu que l'infection
35 naturelle par ce virus peut provoquer deux types de maladies chez cet animal: le Maedi, une pneumonie

interstitielle lymphocytaire qui peut survenir lors de la
primo-infection par ce rétrovirus et une pathologie
neurologique démyélinisante tardive suivant généralement
une phase de latence prolongée, le Visna. La
5 physiopathologie du Visna naturel concorde avec la plupart
des données cliniques et biologiques de la SEP, comme le
rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7, 66-
67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985; 7,
89-98), et Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985;
10 7, 75-82). L'infection expérimentale des moutons par
inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes
du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce
virus dans la génèse de cette affection démyélinisante du
mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et coll. (Rev.
15 Infect. Dis. 1985; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S.
(dans, "Handbook of clinical neurology, 12 : Viral
diseases" R.R. Mc Kendall, ed.. Elsevier science
Publishing, Amsterdam, 1989 , p 453-466), et A. Haase
(Nature 1986; 322, 130-136), elle diffère de l'infection
20 naturelle par ses conséquences neuropathologiques
exacerbées, mais reste proche de la SEP. Il est de plus
notable que, dans l'ensemble des travaux effectués sur ce
sujet par les auteurs précités, notamment, le virus Visna
est régulièrement retrouvé dans les cellules de plexus
25 choroïdes du cerveau qui constituent un site de latence et
de réplication occasionnelle du provirus Visna; la
localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide
céphalo-rachidien (LCR) explique certainement ce phénomène.

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus
30 humains connus a été isolé chez des patients atteints de
SEP par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-
561/ dans : "Current concepts in multiple sclerosis"
Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p.
111-116 / The Lancet 1991; 337, 862-863). Les auteurs ont
35 aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis
in vitro, que des patients atteints de SEP produisaient

des anticorps susceptibles de reconnaître des protéines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoces de certains herpesvirus (Perron et coll. Herpes simplex virus ICP0 and ICP4 immediate-early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell-line from multiple sclerosis.1993. J. Gen. Virol. 74; 65-72).

10 Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561) et qualifiée d'activité "RT de type
15 LM7".

 Récemment, les travaux de la demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans la demande de brevet n° WO 93/20188. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées LM7PC et PLI-2 ont été déposées à l'E.C.A.C.C. respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et
20 93010817, conformément aux dispositions du traité de Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'E.C.A.C.C. sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée
25 POL-2, a été déposée le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, et a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

 A partir des cultures et des isolats précités,
35 caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on s'est ensuite attachés à caractériser

le matériel nucléique associé aux particules virales produites dans ces cultures.

Ainsi les objets de la présente invention sont les suivants:

- 5 - un virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de
10 préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, décrites à la Fig 5, et leurs séquences complémentaires;
- un virus humain, possédant une activité
15 transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce que son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de
20 préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05, et leurs séquences complémentaires;
- un fragment nucléotidique caractérisé en ce
25 qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires;
- undit fragment peut consister en une séquence
30 nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires;
- un ARN et/ou ADN et notamment vecteur de
35 réplication, comprenant un fragment de l'invention;

- une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'ADN caractérisé en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70% d'homologie avec au moins une partie d'un fragment de l'invention;

- unedite amorce a de préférence de 10 à 30 nucléotides;

- une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment de l'invention;

- unedite sonde a de préférence au moins 10 nucléotides;

- une utilisation d'une sonde de l'invention ou d'une amorce de l'invention pour détecter et/ou identifier dans un échantillon biologique un virus associé à la sclérose en plaques;

- une composition thérapeutique antisens notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, comprenant au moins une séquence nucléotidique selon de l'invention;

- un procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une séquence nucléotidique selon de l'invention;

- ledit procédé comprend de préférence, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à la sonde, une étape d'hybridation dudit ARN et/ou dudit ADN avec au moins une amorce de l'invention et une étape d'amplification dudit ARN et/ou ADN;

- un procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose

en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à au moins une sonde de l'invention;

5 - un peptide codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique de l'invention;

 - une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide de l'invention;

10 - un oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus du peptide de l'invention;

 - une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle
15 comprend au moins un peptide de l' invention, ou au moins une protéine de l' invention, ou au moins un oligopeptide de l'invention .

 - une composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou prophylactique, comprenant un ligand
20 spécifique à au moins un peptide, ou un oligopeptide, ou une protéine tels que définis précédemment.

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

25 - selon l'invention, un fragment nucléotidique ou un oligonucléotide est un enchaînement de monomères, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées,
30 l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

 - ainsi un monomère peut être un nucléotide
35 naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée;

dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou un
5 nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-
10 désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation, au niveau du sucre à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), au niveau du
15 groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et
20 l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels,

- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments
25 nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparient pour former un double brin,

- une sonde est un fragment nucléotidique comprenant au moins 10 monomères, avantageusement de 10 à 50 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans
30 des conditions ; une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic telles que les sondes de capture et/ou de détection ou à des fins de thérapie,

- la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire
35 directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

- la sonde de détection est marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la peroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un
5 substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de
10 l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (MANIATIS et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982), "SOUTHERN BLOT" (SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), "NORTHERN
15 BLOT" qui est une technique identique à la technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23 (1977)); avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention comprenant une sonde de capture
20 spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- une autre application de l'invention est une
25 sonde de thérapie, ladite sonde étant susceptible de s'hybrider in vivo sur l'ARN et/ou sur l'ADN pour bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription,

- une amorce est une sonde comprenant de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans
30 des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou
35 analogue,

- l'homologie caractérise le degré de similitude de deux fragments nucléotidiques comparés.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement
5 caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse.

10 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite en référence aux figures annexées dans lesquelles:

- la figure 1 représente des séquences des fragments de type MSRV-1B obtenus après PCR dans la région
15 "pol" définie par Shih et col.,

- la figure 2 représente l'arbre phylogénique des séquences de type MSRV-1B obtenues par PCR dans la région "pol" définie par Shih et col.,

- la figure 3, donne la définition d'une trame de
20 lecture fonctionnelle pour chaque famille de type MSRV-1B/"PCR pol",

- la figure 4 représente selon Fig 4A un alignement des protéiques déduites des consensus A,B,C,D de type MSRV-1B avec des séquences de rétrovirus connus,
25 selon Fig 4B l'arbre phylogénique, et selon Fig 4C l'homologie par rapport à ERV9,

- la figure 5, représente les consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B amplifiées par la technique PCR dans la région "pol" à partir d'ARN viral
30 issu des lignées LM7PC et PLI-2, identifiées sous les références SEQ ID NO1, SEQ ID NO2, SEQ ID NO3 et SEQ ID NO4, et le consensus général avec amorces d' amplification référencée SEQ ID NO5.

- la figure 6, est une représentation de l'activité
35 transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions

produits par les lymphocytes B en culture d'un patient atteint de SEP (l'activité transcriptase inverse (RT) est donnée en ordonnée en dpm (désintégrations par minute) et les numéros des fractions en abscisse),

5 - la figure 7, est une représentation de l'activité transcriptase inverse, comme dans la figure 6, mais à partir d'une culture de lymphocytes B d'un témoin exempt de SEP,

 - la figure 8, illustre les séquences consensus et
10 majoritaires de type MSRV-1B obtenues à partir des lymphocytes B d'un patient atteint de SEP selon Fig 8A, avec :

 * MAJ correspondant à la séquence majoritaire dans laquelle les bases conservées dans tous les cas sont
15 représentées par ATGC, les bases majoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par -,

 * VAR correspondant à la séquence majoritaire (variation) dans laquelle les bases conservées par rapport
20 au consensus sont représentées par ., les bases minoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par - et

 * MIN correspondant aux séquences minoritaires (exception) dans lesquelles les bases conservées par rapport à la séquence majoritaire sont représentées par . et les bases délétées par rapport au consensus par -,

 ainsi que la traduction de la séquence majoritaire, selon Fig 8B, dans laquelle la légende est la
30 suivante :

an: acides nucléiques:

 - en gras, caractères de petites tailles: les sites de restriction des amorces

 - en gras, caractères majuscules, extrémité 3' des
35 amorces

- en souligné, la séquence nucléique majoritaire
codante

prot: séquence protéique:

- en souligné: acides aminés codés par les
5 amorces.

**EXEMPLE 1: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE
FAMILLE MSRV-1B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES
REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS
10 DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7 ET PLI-2.**

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih
et coll. a été utilisée. Cette technique permet, par
traitement de tous les composants du milieu réactionnel
par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant.
15 Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces
différentes mais chevauchantes dans deux séries
successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter
les chances d'amplifier un ADNc résultant d'une quantité
d'ARN faible au départ et encore réduite dans
20 l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN;
ce, d'autant plus la DNase est utilisée dans des
conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer
toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette
enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C
25 pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR
décrite par Shih et coll, a été utilisée sur des fractions
de virions, purifiés comme précédemment pour les
surnageants congelés des cultures LM7, issus cette fois de
lignée lymphoblastoïde B spontanée provenant d'un nouveau
30 cas de SEP, de la culture PLI-2 (ECACC n° 92072201) et de
la culture LM7PC (ECACC n°93010817), ces deux dernières
cultures ayant été obtenues selon les méthodes ayant fait
l'objet du brevet n° WO 93/20188.

Les produits issus de la PCR et de la RT-PCR ont été
35 purifiés après purification sur gel d'agarose selon les
méthodes conventionnelles (Sambrook J., Fritsch E.F., et

Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989), puis resuspendu dans 10ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA CloningTM (British Biotechnology). Les 2µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5µl d'eau distillée stérile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2µl de "PCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning[®] (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virions purifiés comme décrit ci-après, sur

saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 tr/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 tr/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 tr/min (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20µl sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 tr/min (1000 000 g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'utilisation ultérieure qui en sera faite (Ex. Tampon Guanidium Thiocyanate pour l'extraction des ARN; PBS stérile pour le stockage à -80°C).

Les séquences clonées et séquencées à partir de ces deux échantillons ont été analysées à l'aide du logiciel geneworks®, sur la dernière version (n° 79, novembre 93) à ce jour de la banque de données genbank®. Elles correspondent à quatre catégories. Une première

catégorie de séquence (type 1), correspond à des séquences
amplifiées à partir de matériel nucléaire rétroviral
contaminant la transcriptase inverse du MoMuLV utilisée
pour l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire, ainsi
5 que cela a déjà été signalé précédemment. La deuxième
catégorie (type 2), retrouvée dans la majorité des clones
(55% des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2,
et, 67% des clones issus des isolats MS7PG des cultures
LM7PC) correspond à une famille de séquences "pol" proches
10 mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé
ERV-9 ou HSERV-9.

La quatrième catégorie correspond à diverses
séquences trouvées généralement en un exemplaire, ainsi
qu'une de type rétroviral endogène, cependant jamais
15 retrouvées par d'autres approches ou dans d'autres
échantillons provenant de culture exprimant une activité
transcriptase inverse de type LM7.

La deuxième catégorie de séquences représentant la
20 majorité des clones est constituée de séquences dont la
variabilité permet de définir quatre sous-familles de
séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches
entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des
quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela
25 est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 par exemple
(Meyerhans et al., Cell 1989; 58, 901-910), ou comme le
résultat de l'expression de plusieurs provirus endogènes
co-régulés dans les cellules productrices, puisqu'appartenant
à la même famille de rétrovirus endogène et donc sensibles
30 aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par
le provirus répliquatif (Linial M.L. and Miller A.D. dans
"Current topics in microbiology and immunobiology.
Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, p. 125-
152; Swanstrom R. et Vogt P.K. éditeurs, Springer-Verlag,
35 Heidelberg 1990). Cette nouvelle famille de rétrovirus
endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce

rétrovirale dont la génération de quasi-espèces a été obtenue en culture, et qui contient un consensus des séquences décrites à la suite est dénommée MSRV-1B.

5 Dans la figure 1 sont présentées les séquences des différents clones MSRV-1B séquencés lors de cette expérience. Ces séquences présentent une homologie en acides nucléiques allant de 70% à 88% avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données
10 Genebank. L'arbre phylogénétique de ces séquences est présenté dans la figure 2. Dans cette figure, les sous-familles A, B, C D représentent les séquences qui ont été retrouvées de manière prépondérante dans des expériences similaires répétées ultérieurement, dans les échantillons
15 d'ARN pur de virions purifiés avec les isolats MS7PG et POL-2. A partir de ces familles de séquences, quatre séquences nucléiques "consensus" représentatives de différentes quasi-espèces d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène ou de différentes sous-familles
20 d'un rétrovirus endogène MSRV-1B, ont été définies. Ces consensus représentatifs sont présentés dans la figure 3, avec la traduction en acides aminés. Une trame de lecture fonctionnelle existe pour chaque sous-famille de ces séquences MSRV-1B et l'on peut voir que la trame de
25 lecture ouverte fonctionnelle correspond à chaque fois à la séquence acides aminés venant en deuxième ligne sous la séquence acide nucléique. Un alignement des consensus A,B,C,D et d'un consensus général traduits en protéine avec les séquences de rétrovirus connus est présenté dans
30 la figure 4. Les consensus généraux en acides nucléiques des séquences MSRV-1B obtenues par cette technique PCR dans la région "pol" sont présentés dans la figure 5.

EXEMPLE 2: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE
35 FAMILLE MSRV-1B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES

**REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS
DE LYMPHOCYTES B D'UN NOUVEAU CAS DE SEP.**

La même technique PCR modifiée d'après la
5 technique de Shih et coll. a été utilisée pour amplifier
et séquencer le matériel nucléaire ARN présent dans une
fraction de virions purifiés au pic d'activité
transcriptase inverse "de type LM7" sur gradient de
saccharose, selon les protocoles décrits dans l'exemple 1,
10 à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue
par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un
patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV)
après mise en culture des cellules lymphoïdes sanguine
dans un milieu de culture approprié contenant une
15 concentration appropriée de cyclosporine A. Une
représentation de l'activité transcriptase inverse dans
les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de
purification des virions produits par cette lignée (Duc.)
est présentée dans la figure 6. De même, les surnageants
20 de culture d'une lignée B obtenue dans les mêmes
conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose en
plaques ont été traités dans les mêmes conditions et le
dosage de l'activité transcriptase inverse dans les
fractions du gradient de saccharose s'est avéré négatif
25 partout (bruit de fond) et est présenté dans la figure 7.
La fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de
SEP et la même fraction sans activité transcriptase
inverse du gradient témoin non-SEP, ont été analysées par
la même technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih
30 et coll., suivie des mêmes étapes de clonage et de
séquençage tels que décrites dans l'exemple 1.

L'analyse des clones recombinants prélevés au
hasard a fourni les mêmes quatre catégories de séquences
35 que précédemment. Les résultats sont présentés dans le
tableau annexé. Il est tout à fait notable que les

séquences de type MSRV-1B soient retrouvées dans le seul matériel associé à un pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de SEP. Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec le
5 matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) dans 26 clones recombinants pris au hasard. Seules les séquences contaminantes de types Mo-MuLV et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées chez ce témoin. La différence de résultats est à
10 l'évidence hautement significative (χ^2 , $p < 0,001$). L'analyse des séquences de type MSRV-1B obtenues à partir de la lignée B de ce patient SEP est présentée dans la figure 8 .

TABLEAU

REPARTITION DES SEQUENCES OBTENUES PAR PCR
MODIFIEE D'APRES SHIH ET COLL. A PARTIR DE CULTURE
DE LYMPHOCYTES B D'UN PATIENT ATTEINT DE SCLEROSE
EN PLAQUES VERSUS UN PATIENT CONTROLE

	TYPE 1	TYPE 2	TYPE 3 MSRV-2B	TYPE 4
Lympho B patient SEP	0 0%	11 48%	4 17%	8 35%
Lympho B patient non SEP	5 19%	0 0%	0 0%	21 81%



1/ Virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en
5 plaques, caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences
10 complémentaires.

2/ Virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en
15 plaques, caractérisé en ce que son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

20 3/ Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences
25 complémentaires.

4/ Fragment selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 %
30 d'homologie avec une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N01, SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

5/ ARN et/ou ADN et notamment vecteur de répllication, comprenant un fragment selon la revendication 3 ou 4.

35 6/ Amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'ADN, caractérisée en ce

qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70% d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 3 ou 4.

5 7/ Amorce selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle a de 10 à 30 nucléotides.

8/ Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence
10 nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 3 ou 4.

9/ Sonde selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle a au moins 10 nucléotides.

15 10/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 8 ou 9 ou d'une amorce selon la revendication 6 ou 7, pour détecter et/ou identifier dans un échantillon biologique un virus associé à la sclérose en plaques.

11/ Composition thérapeutique antisens notamment
20 pour le traitement de la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 8 ou 9.

12/ Procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un
25 échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 8 ou 9.

13/ Procédé selon la revendication 12, caractérisé
30 en ce que, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce selon la revendication 6 ou 7 et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

14/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon
35 biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un

ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à au moins une sonde selon la revendication 8 ou 9.

5 15/ Peptide codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique selon la revendication 3 ou 4.

16/ Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide selon la revendication 15.

10 17/ Oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus du peptide selon la revendication 15.

15 18/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide selon la revendication 15, ou au moins une protéine selon la revendication 16, ou au moins un oligopeptide selon la revendication 17.

20 19/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ligand spécifique à au moins un peptide selon la revendication 15, ou à au moins une protéine selon la revendication 16, ou au moins un oligopeptide selon la revendication 17.

L	CG93 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTCTTGGT CAGGTACTGG CCCAGACTCT	48
L	CG95 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTCTTGGT CAGGTACTGG CCCAGACTCT	48
J	CG74 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTCTTGGT CAGGTACTGG CCCAGACTCT	48
I	CG139*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTCTTGGT CAGGTACTGG CCCAGACTCT	48
D	CG134 IC*	-GTTTACGG- ATAGCCCTCA TCTCTTGGT CAGGTACTGG CCCAGACTCT	47
D	CG32*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG ATCCAAACTT	48
H	CG106*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
B	CG10*	--TTCAAGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	47
B	CG25*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	48
D	CG30*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	48
C	CG20*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	48
B	CG12*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	48
B	CG39*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	48
B	CG14 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	48
B	CG16 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CTCATACTCT	48
R	CG 154*	--TTCAAGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	47
R	CG156 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
I	CG136*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
R	CG 159*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
R	CG158*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
R	CG163*	--TTCAAGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	47
R	CG 155*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGT CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
K	CG83*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
K	CG84 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
K	CG85*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
D	CG28*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
L	CG91 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCTAGACTCT	48
Q	CG117*	-GTTTAGGG- ATAGCTCCCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
Q	CG 147*	-GTTTAGGG- ATAGCTCCCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
Q	CG 146 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCTCCCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
Q	CG152 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCTCCCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
Q	CG 149*	-GTTTAGGG- ATAGCTCCCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
E	CG133*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
H	CG62*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
J	CG149*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
C	CG23*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
E	CG35*	-GTCCACGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
N	CG113*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
N	CG114 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
L	CG90 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
N	CG112*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
N	CG109 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
C	CG129-IC	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
C	CG130*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
J	CG141*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
I	CG68 IC*	-GTTTAGGG- ATAGCCCTCA TCTATTGGC CAGGACTTGG CCCAGACTCT	48
L	CG93 IC*	AGGCCACTTC TCAGGTCGAG GACACTCTGT CCTTCAG-	85
L	CG95 IC*	AGGCCACTTC TCAGGTCGAG GACACTCTGT CCTTCAG-	85
J	CG74 IC*	AGGCCACTTC TCAGGTCGAG GACACTCTGT CCTTCAG-	85
I	CG139*	AGGCCACTTC TCAGGTCGAG GACACTCTGT CCTTCAG-	85
D	CG134 IC*	AGGCCACTTC TCAGGTCGAG GACACTCTGT CCTTCAG-	84
D	CG32*	GAGTCATTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
H	CG106*	GAGTCATTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
B	CG10*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	84
D	CG25*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
D	CG30*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
C	CG20*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
B	CG12*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
B	CG39*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
B	CG14 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
B	CG16 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
R	CG 154*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	84
R	CG156 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
I	CG136*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
R	CG 159*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
R	CG158*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
R	CG163*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	84
R	CG 155*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
K	CG83*	GAGTCATTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
K	CG84 IC*	GAGTCATTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
K	CG85*	GAGTCATTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
D	CG28*	GAGTCATTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
L	CG91 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
Q	CG117*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
Q	CG 147*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
Q	CG 146 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
Q	CG152 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
Q	CG 149*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
E	CG133*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
H	CG62*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
J	CG149*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
C	CG23*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
E	CG35*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
H	CG113*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
H	CG114 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	86
L	CG90 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
H	CG112*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
N	CG109 IC*	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
C	CG129-IC	GAGGCAGTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
C	CG130*	AGGCCACTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
J	CG141*	AGGCCACTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85
I	CG68 IC*	AGGCCACTTC TCATACCTGG ACACCTCTGT CCTTCAG-	85

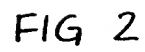


FIG 3

CONSENSUS A

GTTTAGGGATAGCCC TCATCTCTTTGGTCA GGTACTGGCCCAAGA TCTAGGCCACTTCTC 60
 V . G . P S S L W S G T G P R S R P L L
 F R D S P H L F G Q V L A Q D L G H F S
 L G I A L I S L V R Y W P K I . A T S Q
 AGGTCCAGGCACTCT GTTCCTTCAG 85
 R S R H S V P S
 G P G T L F L Q
 V Q A L C S F

CONSENSUS B

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCCTAGCTCAATA CTTGAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G T S S I L E P V L
 F R D S P H L F G Q A L A Q Y L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . L N T . A S S H
 ATACCTGGCACTCT TGTCTTCGGT 86
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L R
 T W T L L S F G

CONSENSUS C

GTTCAGGGATAGCCC CCATCTATTTGGCCA GGCATTAGCCCAAGA CTTGAGTCAATTCTC 60
 V Q G . P P S I W P G I S P R L E S I L
 F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S
 S G I A P I Y L A R H . P K T . V N S H
 ATACCTGGCACTCT TGTCTTCAG 85
 I P G H S C P S
 Y L D T L V L Q
 T W T L L S F

CONSENSUS D

GTTCAGGGATAGCTC CCATCTATTTGGCCT GGCATTAACCCGAGA CTTAAGCCAGTTCTC 60
 V Q G . L P S I W P G I N P R L K P V L
 F R D S S H L F G L A L T R D L S Q F S
 S G I A P I Y L A W H . P E T . A S S H
 ATACGTGGCACTCT TGTCTTTGG 85
 I R G H S C P L
 Y V D T L V L W
 T W T L L S F

FIG 4A

Consensus	...SP.LFQ. ..A..L...R ...P.....	30
HIV1 QG/YM	WKGSPAIFQS SMIKILEPFR KQNPDIYIYQ	30
HIV2 QG/YM	WKGSPAIFQH TMQVLEPFR KANKDVIYIQ	30
VISNA QG/YM	WKLSPAVYQF TMQKILRGWI EEHPMIQFGI	30
CAEV QG/YM	WKLSPSVYQF TMQETLEDWI QQHPETQFGI	30
MMTV QG/YM	MKNSPTLCQK FVDKAILTVR DKYQDSYTVH	30
HERVK QG/YM	MLNSPTICQT FVGRALQPV R EKFSDCYIIH	30
JSRV QG/YM	MINSPITLCQK FVATAIAPVR QRFPQLYLVH	30
MPMV QG/YM	MANSPTLCQK YVATAIHKVR HAWKQMYIIH	30
HTLV1 QG/YM	FKNSPTLFEM QLAHILQPIR QAFQCTILQ	30
HTLV2 QG/YM	FKNSPTLFEQ QLAAVLNPMR KMFPSTIVQ	30
Trad cons30 B	FRDSPHLFGQ ALAQYLSQF- -SYLDTLVLR	28
Trad cons33/28 C	FRDSPHLFGQ ALAQDLSQF- -SYLDTLVLQ	28
Trad cons24 D	FRDSSHFGQ ALTRDLSQF- -SYVDTLVLW	28
ERV9 QG/YM	FRDSPHLFGQ ALAKDLGHF- -SSPGTILVLQ	28
Trad cons37 A	FRDSPHLFGQ VLAQDLGHF- -SGPGTILFLQ	28

FIG 4B

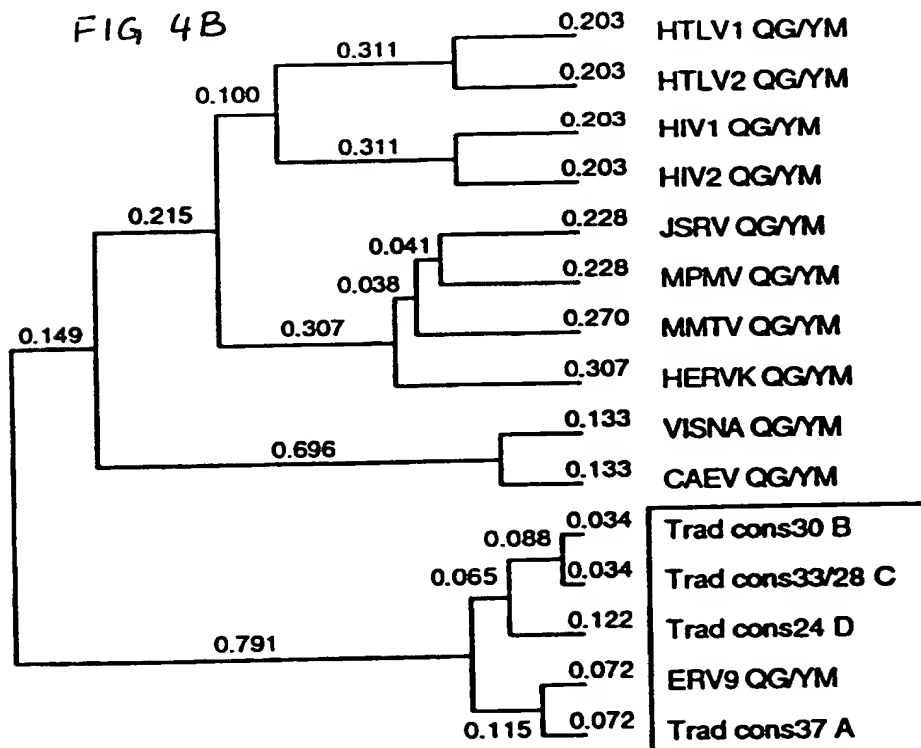


FIG 4C

		Taille	% d'homologie
Consensus	FRDSPHLFGQ ALAQDLSQFS Y.DTLVLQ	28	
Trad cons30 BY.....L.....R	28	71%
Trad cons33/28 CL.....	28	79%
Trad cons24 D	...S...L..TR.....V.....W	28	64%
ERV9 QG/YMK..GH..SPG.....	28	100%
Trad cons37 AV.....GH..GPG..F..	28	86%

FIG 5

CONSENSUS A

Consensus GTTTAGGGAT ANOCTCATC TCTTTGGTCA GGTACTGGCC CAAGATCTAG 50
 Consensus GCCACTTCTC AGGTCCAGSN ACTCTGTGCC TTICAG 85

(SEQ ID NO 1)

CONSENSUS B

Consensus GTTCAGGGAT AGCCCCCATC TATTTGGCCA GGCCTAGCT CAATACTTGA 50
 Consensus GCCAGTCTC ATACCTGGAC AYTCTGTGCC TTCCGT 86

(SEQ ID NO 2)

CONSENSUS C

Consensus GTTCARRGAT AGCCCCCATC TATTTGGCOW RGYATTAGCC CAAGACTTGA 50
 Consensus GYCAATTCTC ATACCTGGAC ACTCTGTGCC TTYRG 85

(SEQ ID NO 3)

CONSENSUS D

Consensus GTTCAGGGAT AGCTOCCATC TATTTGGCCT GGCATTAAAC CGAGACTTAA 50
 Consensus GCCAGTCTCY ATAAGTGGAC ACTCTGTGCC TTIGG 85

(SEQ ID NO 4)

CONSENSUS GENERAL MSRV-1B AVEC AMORCES D'AMPLIFICATION

Consensus GIGTTGOCAC AGGGGTITAR RGATANCYCY CATCTMTTG GYCWRGYAYT
 Consensus RRCYCRAKAY YTRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYTCTB KYCCTTYRGT
 Consensus ACATGGATGA C

(SEQ ID NO 5)

FIG 6

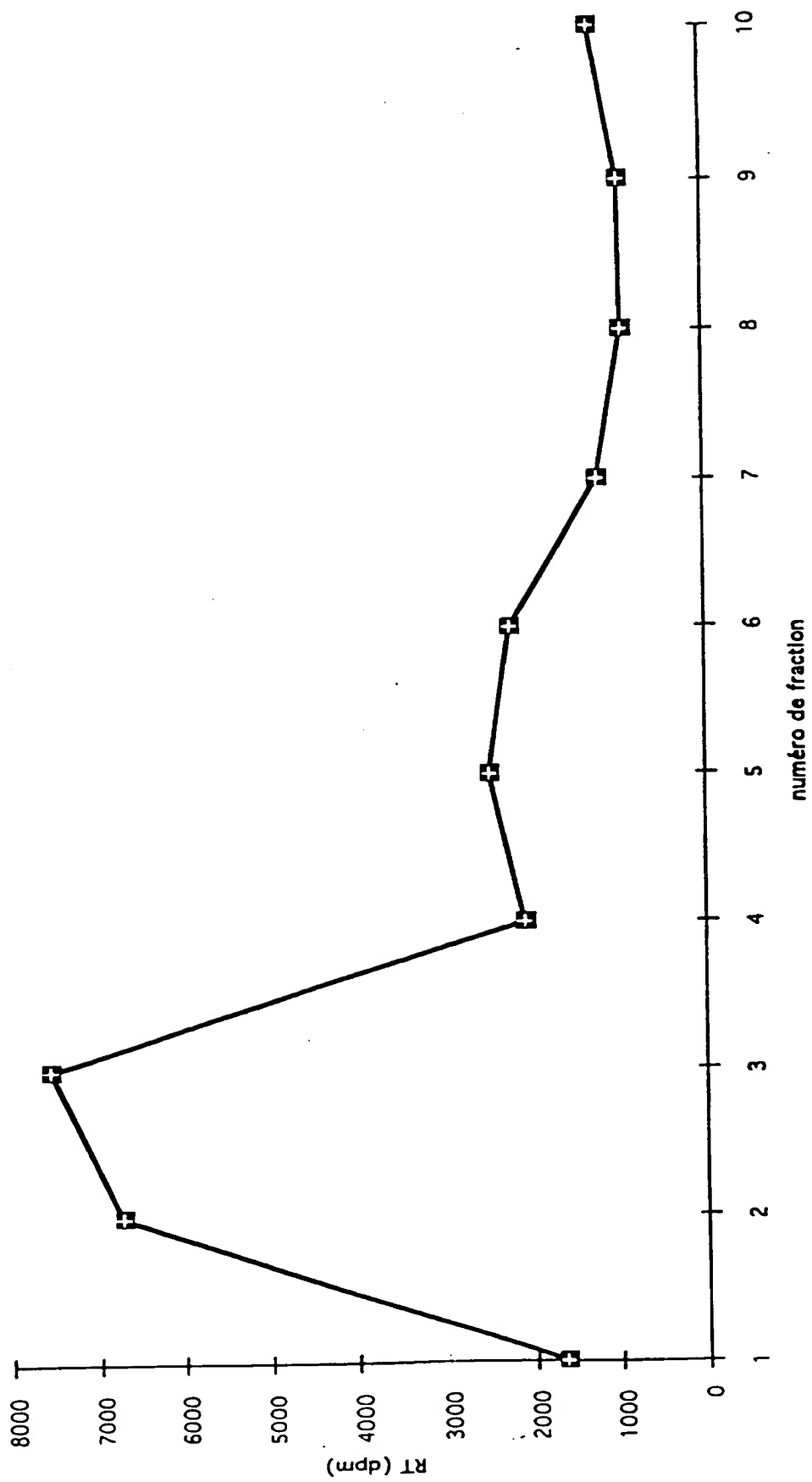


FIG 7

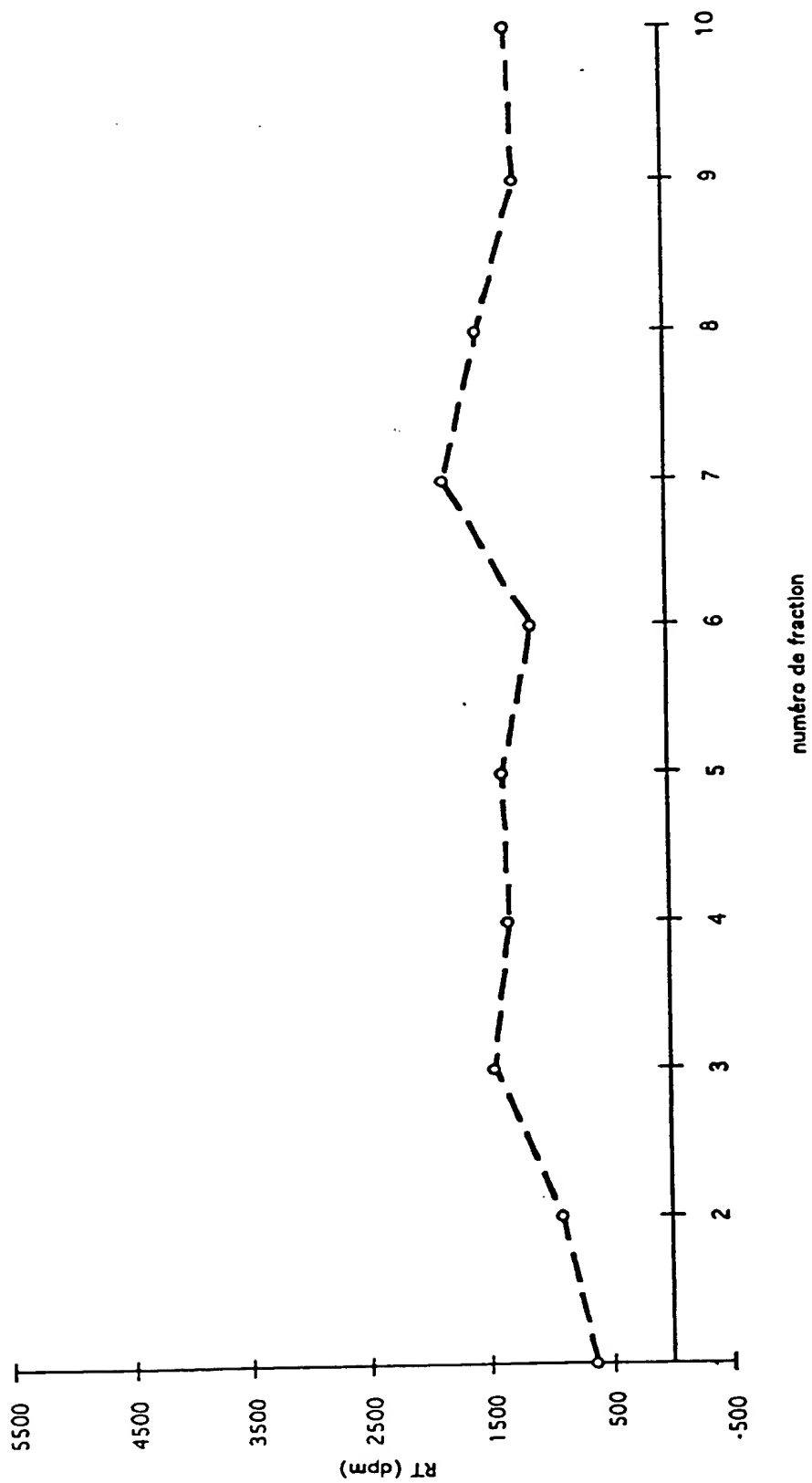


FIG 8A

Consensus	CTTGGATCCA GNGYTVMMC ARGGGNNCAG GGNRTANNOC CCNTCINTYW	50
MAJ	CTTGGATCCA GtGtTgcCaC AgGGGtTCAG GG-aTAGcCC CCaTCTaTtt	50
VARc.aa.c. .a...c.C.. ..gg...a..ca	50
Consensus	GGMCAGGSTA TTAGYCCAAG ACTTGAKCCA GNNCTCATACT CTGGAACACT	100
MAJ	GGcCAGGc-A TTAGcCCAAG ACTTGAgCCA GttCTCATACT CTGGA-CACT	100
VAR	..a.....gt.t.....a.....	98
Consensus	CTTGcNCCTT CGGNACGRKG GNATGACMIN CTGANGCTTG AGA	143
MAJ	CTTG-TCCTT CGGTAC-atG G-ATGACcTg CTGAaGCTTG AG-	141
VARc-----gggG .c.....a.c CTGANGCTTG AG-	137
MIN----- -----, ...-.....	125

FIG 8B

an	<u>CTTGGATCCA GTGTTCGCAC AGGGGTTTCAG GGATAGCCCC CATCTATTIG</u>	50
prot	<u>V L P O G F R D S P H L F G</u>	
an	<u>GCCAGGCATT AGOCCAAGAC TTGAGCCAGT TCICATACTT GGACACTCTT</u>	100
prot	<u>Q A L A Q D L S Q F S Y L D T L</u>	
an	<u>GTCCTTCGGT ACATGGATGA CCTGCTGaAG CTTGAG</u>	137
prot	<u>V L R Y M D D</u>	

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 495572
FR 9401530

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	WO-A-93 20188 (BIO MERIEUX) * le document en entier * ---	1,2
A	AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.8, no.5, Mai 1992 page 922 H. PERRON ET AL 'Retrovirus isolation from patients with multiple sclerosis: epiphenomenon or causative factor ?' * abrégé * ---	1-19
D,A	LANCET THE, vol.337, no.8745, 6 Avril 1991, LONDON GB pages 862 - 863 H. PERRON ET AL 'Isolation of retrovirus from patients with Multiple Sclerosis' * le document en entier * ---	1,2
A	RESEARCH IN VIROLOGY, vol.143, no.5, 1992 pages 337 - 350 H. PERRON ET AL 'In vitro transmission and antigenicity of a Retrovirus isolated from a Multiple Sclerosis patient' * le document en entier * ---	1,2
D,A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol.74, 1993 pages 65 - 72 H. PERRON ET AL 'Herpes Simplex Virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with Multiple Sclerosis' * le document en entier * ---	1,2
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 Octobre 1994		Le Cornec, N
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 (01.92) (P04C15)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 495572
FR 9401530

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-93 07259 (SCLEROSE-FORENINGEN (THE DANISH MS-SOCIETY)) * le document en entier *	1-19
D,A	----- CURRENT CONCEPTS IN MULTIPLE SCLEROSIS, 1991, AMSTERDAM, ELSEVIER pages 11 - 116 H. PERRON ET AL 'Isolations of an unknown retrovirus from CSF, blood, and brain cells of patients with multiple sclerosis' * le document en entier *	1,2
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. C.L.S)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
7 Octobre 1994		Le Cornec, N
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 150 (01.93) (P.O.C.U.S)